
学位論文

歯肉上皮細胞におけるカルプロテクチンの発現調節

林 能理子

キーワード：歯肉上皮細胞, 分化, カルプロテクチン, S100A8/A9, C/EBP α

Regulation of Calprotectin Expression on the Differentiation of Human Gingival Epithelial Cells.

Noriko HAYASHI

Abstract : Calprotectin, a heterodimer of S100A8 and A9, is an antimicrobial protein produced by leukocytes, macrophages and epithelial cells. Although calprotectin plays an important role in innate immunity, the regulatory mechanism is unclear. Calprotectin is localized in a spinous cell layer of the gingival epithelium, hence, it is hypothesized that the calprotectin expression in keratinocytes may be related to the epithelial cell differentiation. It is reported that interleukin-1 α (IL-1 α) and calcium stimulate keratinocyte differentiation and that transforming growth factor- β (TGF- β) and retinoic acid (RA) suppress the differentiation. To study the regulatory mechanism of calprotectin in differentiation, the effects of IL-1 α , calcium, TGF- β and RA on the expression of S100A8/A9 was investigated in cultured human gingival keratinocytes. Immunostaining of cultured cells was performed to detect the differentiation markers of epithelial cells such as cytokeratin 14 (CK14), involucrin and filaggrin. Northern blotting and ELISA were performed to detect calprotectin mRNA and proteins, respectively. Human S100A8 and S100A9 promoter was characterized by luciferase assay and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Immunohistochemical findings showed that involucrin and filaggrin markedly expressed in cells treated with IL-1 α and calcium but rarely expressed in cells treated with TGF- β and that CK14 evenly expressed in all experimental group. From Northern blotting and ELISA analysis, mRNA expression of S100A8/A9 mRNAs and the protein levels were increased by IL-1 α and calcium, whereas they were decreased by TGF- β . Addition of RA inhibited the IL-1 α -induced stimulation of S100A8/A9 expression. Luciferase assay of 5'-upstream region of S100A8 in HaCaT clonal epithelial cells revealed that the -765/-722 and -256/-111 were essential to A8 promoter activity and each domain contained C/EBP (CCAAT enhancer binding protein) binding sites. In the case of S100A9, the result showed that the -188/-53 region is essential to A9 promoter activity and this domain also contained C/EBP binding sites. EMSA showed that DNA binding activity of C/EBP α were enhanced in keratinocytes by IL-1 α or calcium, but suppressed by TGF- β . These results demonstrate that calprotectin expressions are related to the differentiation of keratinocytes and C/EBP α is one of the regulators of calprotectin expression in keratinocytes.

緒 言

歯周病は歯周病原性細菌による感染とその結果生じる過剰な宿主免疫応答により惹起される慢性炎症性疾患である。病原菌の感染に対して生体には様々な防御機構が存在しており、なかでも歯肉上皮は歯周病の発症・進行を予防する上において第一番目のバリアーであると言える¹⁾。歯肉上皮は角化重層扁平上皮であり、基底細胞が増殖し、有棘、顆粒、角化細胞へと分化して上方に移動する構造をもち、物理的バリアーとして機能している²⁾。さらに歯肉上皮細胞はサイトカインやケモカイン、ディフェンシンやカルプロテクチンといった抗菌ペプチドを産生し^{3~5)}、生化学的バリアーとしても機能している。とくに、近年これらの抗菌ペプチドと歯周病発症との関連が自然免疫の観点から注目されている⁶⁾。

カルプロテクチンは白血球由来の主要な蛋白 Leukocyte 1 (L1) として顆粒球の細胞質ゾル画分より分離された、好中球の細胞質ゾル蛋白の60%を占める蛋白である⁷⁾。カルプロテクチンは S-100 カルシウム結合性蛋白に属し、S100A8 と S100A9 の2つの蛋白複合体から構成されており、マクロファージ遊走抑制因子関連蛋白 (MRP8/MRP14)、囊胞性線維症抗原、p8/p14 あるいは calgranulin A/B とも呼ばれている⁸⁾。カルプロテクチンは好中球だけでなく単球/マクロファージや口腔粘膜および膣粘膜の上皮細胞にも発現が認められている⁷⁾。また、血漿、唾液、歯肉溝滲出液、尿、関節腔滑液、大便中にも存在し、そのレベルはリウマチ性関節炎や肺炎、敗血症、髄膜炎、潰瘍性大腸炎などのいくつかの炎症性疾患で上昇することが知られている⁹⁾。このように種々の組織におけるカルプロテクチンレベルが疾患の臨床症状や病態と密接な関連性を示すことから、カルプロテクチンは有用な疾患活動指標の一つとして評価されている。

我々の研究室では、これまでにカルプロテクチンが歯肉溝滲出液中にも存在することやそのレベルが歯周病の炎症程度と相関することより、歯肉溝滲出液中のカルプロテクチンが歯周病の有用な疾患活動指標となる可能性を示すとともに^{10, 11)}、好中球や単球では TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインや *Porphyromonas gingivalis* のリポ多糖によりカルプロテクチンが遊離されることを報告している^{12, 13)}。カルプロテクチンは亜鉛に対するキレート作用をもち¹⁴⁾、これによって *Candida albicans*, *Escherichia coli* をはじめ歯周病原菌の *Capnocytophaga sputigena* や *P. gingivalis* など、いくつかの細菌の増殖を抑制し、さらに好中球の血管外遊走や単球への走化にも関与する^{8, 15~17)} ことから、自然免疫において重要な役割を示すことが知られている。これらのことより、歯肉溝滲出液中のカルプロテクチンは歯周病の発症や進行における重要な防御因子の一つとして機能しているものと考えられる。

カルプロテクチンは健康な皮膚組織では発現が認めら

れないが⁷⁾、皮膚の創傷治療においてはカルプロテクチンの発現が上昇していることが報告されている¹⁸⁾。健康な歯肉上皮では発現することが確認されており⁵⁾、カルプロテクチンは、口腔粘膜上皮細胞への *P. gingivalis* や *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* などの細菌の侵入を抑制する^{19, 20)} ことから、歯肉上皮組織におけるカルプロテクチンは細菌の侵入に対して予防的役割を果たしているものと考えられる。一方、カルプロテクチンが上皮細胞株である HaCaT や TR146 の細胞骨格の再構築に関与することで上皮細胞の分化促進に関与しているとの報告^{18, 21)} や、単球細胞株 HL-60 では分化指標の発現に一致してカルプロテクチンが発現するという報告²²⁾ がある。このように、カルプロテクチンを細胞の分化という視点からとらえた研究も多くみられ、分化能を喪失した上皮細胞株ではカルプロテクチンの発現がみられないという興味深い報告もある²³⁾。健康な歯肉上皮組織において、カルプロテクチンは有棘細胞層に局限して発現しているが²⁴⁾、この発現が歯肉上皮細胞の分化と関連しているかどうかは明らかにされていない。一般に、上皮細胞の分化はカルシウムあるいは transforming growth factor- β (TGF- β) や epidermal growth factor (EGF) といった生理活性物質や成長因子、interleukin-1 α (IL-1 α)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカインなどの因子によって調節されている^{25~27)}。一方、カルプロテクチンの発現調節については S100A9 の上流領域にいくつか転写調節領域が存在することが見出されているが^{28, 29)}、関連する転写因子や S100A8 の転写調節についての研究は少ないのが現状である。そこで本研究では、歯肉上皮細胞を用いてカルプロテクチン発現が上皮細胞分化調節因子によりどのような影響を受けるかについて検討するとともに、上皮細胞株 HaCaT 細胞を用いて S100A8 および S100A9 遺伝子の転写調節機構を調べ、上皮細胞の分化促進に関連する転写調節因子、とくに CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) のカルプロテクチン発現への関与について検索した。

材料および方法

1. 細胞と細胞培養法

ヒト歯肉上皮細胞は Matsuyama らの方法³⁰⁾ に従って歯肉組織より分離した。すなわち、健康な歯肉組織を2~3 mm の大きさに切断し、1,250 μ g/ml ストレプトマイシン、5 μ g/ml アンホテリシン B、1,000 U/ml ペニシリン含有 DMEM (日水製薬、東京) にて洗浄後、I 型コラーゲン表面処理培養ディッシュ (ϕ 35 mm) (IWAKI, 東京) 上で10分間室温にて乾燥させ、歯肉片をディッシュに付着させた。引き続き、付着した歯肉片を10% FBS 含有 DMEM で7日間培養し、得られた歯肉上皮細胞を回収し、再び I 型コラーゲン表面処理培養ディッシュ (ϕ 100 mm) に播種した。細胞培養は、0.2 ng/ml 上皮細胞増殖因子 (EGF) と25 μ g/ml ウシ下垂体抽出物 (BPE),

および200 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン含有 keratinocyte-SFM 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて37℃, 5%炭酸ガス, 95%気相下で行い, 継代三代目の細胞を実験に使用した。すなわち, 歯肉上皮細胞を $12 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ となるようにI型コラーゲン表面処理培養ディッシュ ($\phi 35 \text{ mm}$, $\phi 100 \text{ mm}$) に播種し, サブコンフルエントに達したところで, 10 ng/ml IL-1 α (和光純薬工業, 大阪), 10 ng/ml TGF- β (和光純薬工業), 1.0 mM CaCl₂ (和光純薬工業) を添加し, それぞれ24, 36, 48時間培養して以降の実験を行った。また, IL-1 α が誘導する上皮細胞の分化を阻害するために300 $\mu\text{g/ml}$ レチノイン酸 (和光純薬工業) と10 ng/ml IL-1 α を同時に加え培養を行った。HaCaT細胞³¹⁾ はN. E. Fusenig教授 (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) より供与された。このHaCaT細胞を24 well dishに $25 \times 10^5/\text{well}$ となるように播種し, keratinocyte-SFM (0.2 $\mu\text{g/ml}$ EGF, 25 $\mu\text{g/ml}$ BPEを含む) 培地にて24時間培養後, 欠失変異株を導入した。

2. 免疫組織化学染色

歯肉上皮細胞をI型コラーゲン表面処理培養スライドガラス (IWAKI) 上に播種し, サブコンフルエントに達したところで10 ng/ml IL-1 α , 10 ng/ml TGF- β , 1.0 mM CaCl₂を加え48時間培養し, 各因子の上皮細胞分化への影響を免疫組織化学的手法によって検討した。細胞分化の指標として, 基底細胞分化マーカーであるcytokeratin14 (CK14), および有棘・顆粒細胞分化マーカーであるinvolucrinとfilaggrinに注目し, その発現をVECTASTAIN ABC-GO kit (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) およびNBT substrate kit (Vector laboratories Inc.) を用いた免疫組織化学染色によって調べた。すなわち, 4%パラホルムアルデヒドにて10分間固定し, アセトン/エタノール (1:1) で処理した後, ウマ血清 (Vector laboratories Inc.) を60分間作用させ, 非特異的反応を阻止した。次に, 一次抗体であるマ

ウス抗ヒトCK14 IgG抗体 (Cymbus Biotechnology Ltd., Hants, UK) 20倍希釈液, マウス抗ヒトinvolucrin IgG抗体 (Neomarker, Fromont, CA, USA) 200倍希釈液, マウス抗ヒトfilaggrin IgG抗体 (Biochemical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) 100倍希釈液をそれぞれ4℃で12時間反応させ, ネガティブコントロールとしてマウスIgG抗体を用いた。引き続き, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 不含リン酸緩衝液 (PBS(-)) で洗浄後, ビオチン標識ウマ抗マウスIgG抗体を室温にて1時間反応させた。さらにPBS(-) で洗浄し, アビジン-ビオチン標識グルコースオキシダーゼ複合体 (Vector laboratories Inc.) を加え, 再度洗浄した後, ニトロブルーテトラゾリウムにて発色させた。なお, 対比染色はNeutral Red (和光純薬工業) を用いて行った。

3. カルプロテクチンおよびinvolucrin mRNAの発現分析

歯肉上皮細胞をI型コラーゲン表面処理培養ディッシュ ($\phi 100 \text{ mm}$) に播種し3日間培養後, 10 ng/ml IL-1 α , 10 ng/ml TGF- β , 1.0 mM CaCl₂を加え, さらに36時間培養し, RNeasy (QIAGEN Science, Valencia, CA, USA) を用いて通法に従いtotal RNAを抽出した。さらに, 3 μg RNAを2Mホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル電気泳動によって分画した後, 10倍濃度のSSPE (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM リン酸緩衝液 pH7.4) を用いたキャピラリートランスファー法にてHybond TM N⁺ メンブレン (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に転写した。引き続き, 0.05 N水酸化ナトリウム溶液でアルカリ固定した後, プレハイブリダイゼーションを42℃で2時間行った。次に, S100A8とA9および内部標準として用いたGAPDHのcDNAをReady-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を用いて合成し, 表1に示すプライマーを用いてPCR法で増幅した後, PCR purification kit (QIAGEN Sciences) を用いてPCR産物の精製を行った。さらに精製したPCR産物にランダムプライマーDNAラ

表1 用いたプライマーの塩基配列

増幅遺伝子	塩基配列	
S100A8	sense	5'-GCTGGAGAAAGCCTTGAAGTC-3'
	antisense	5'-CCACGCCATCTTTATCACCA-3'
S100A9	sense	5'-TCGCAGCTGGAACGCAACATA-3'
	antisense	5'-AGCTCAGCTGCTTGTCTGCAT-3'
GAPDH	sense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
	antisense	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
Involucrin	sense	5'-TGTTCTCTCTCCAGTCAATACCC-3'
	antisense	5'-ATTCTCATGCTGTTCCTCAGTGC-3'
-1,500/+540 S100A8	sense	5'-TTCCACCTTTTGGCTCTTGTAAA-3'
	antisense	5'-GTAGATCTG ATGCCACGGAAGTGGCCAC-3'
-1,000/+430 S100A9	sense	5'-TCCCCCGGGATCACTGTGGAGTAGGGGAAGGG-3'
	antisense	5'-GTAGATCTCGTCTTGCACTCTGTGTAA-3'

ベリングキット (宝酒造, 京都) を用いて [α - 32 P]-dCTP (Amersham Biosciences) を標識して各種プローブを作製し, 42°C で12時間ハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド, 10% SSPE, 5 x Denhardt 液, 0.5% SDS, 200 mg/ml サケ精子 DNA を含む溶液を用いた。ハイブリダイゼーション後, メンブレンを2 x SSPE, 0.1% SDS を含む洗浄液で65°C にて3回洗浄し, イメージングプレートを用いて2~4時間のオートラジオグラフィを行った。得られたバンドのデンストメトリック分析には BAS-2000 II イメージ分析システム (富士フィルム, 東京) を用いた。

IL-1 α によるカルプロテクチン発現上昇に及ぼすレチノイン酸の影響を調べるために, 歯肉上皮細胞をI型コラーゲン表面処理培養ディッシュ (ϕ 100 mm) に播種し3日間培養後, 10 ng/ml IL-1 α と300 μ g/ml レチノイン酸を加え, さらに36時間培養し, RNeasy (QIAGEN Sience) を用いて, total RNA を抽出した。次に, involucrin mRNA 発現を RT-PCR 法にて分析した。用いた involucrin の sense および antisense プライマーを表1に示す。得られた PCR 産物は1.5% アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し, ゲルをエチジウムブロマイドで染色後, UV トランスイルミネーターを用いてバンドを検出した。

4. カルプロテクチン蛋白の定量

細胞内および培養上清中のカルプロテクチン量を ELISA 法に基づいた Calprest[®] (Calpro AS, Oslo, Norway) にて測定した。すなわち, 歯肉上皮細胞をI型コラーゲン表面処理ディッシュ (ϕ 35 mm) に播種し, 10 ng/ml IL-1 α , 10 ng/ml TGF- β , 1.0 mM CaCl₂ 存在下で48時間培養後, 培養上清を回収し, これに蛋白分解酵素阻害剤 (1 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml TPCK, 1 μ g/ml TLCK, 1 μ g/ml pepstatin) を加え, 培養上清画分とした。また, 歯肉上皮細胞を回収し, 超音波処理を行い細胞画分とした。これら培養上清画分と細胞画分から100 μ l ずつ取り, 抗カルプロテクチン抗体 (ウサギ) でコートされた96 well plate に加えて室温で45分反応させ, 洗浄後, アルカリフォスファターゼ標識のウサギ抗カルプロテクチン抗体を加えて室温で45分間反応させた。引き続き, 基質である p-ニトロフェノールリン酸溶液を200 μ l 加えて1時間反応させた後, 405 nm で吸光度を測定した。

DNA 量は Labarca らの方法³²⁾ に従い測定した。すなわち, 細胞を PBS(-) で洗浄後, 0.15 N 水酸化ナトリウムで溶解して回収し, 5分間遠心分離 (5000 x g, 4°C) を行い, その上清を DNA 試料とした。DNA 試料を0.015 N 塩酸で中和した後, 蛍光色素 Hoechst 33258 (和光純薬工業) を加えてマイクロプレートリーダー (BIO-RAD モデル550, Bio-Lad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて吸光度458 nm で測定した。

5. S100A8およびA9の5'上流領域を含むプラスミドと欠失変異株の作製

S100A8およびA9のそれぞれ5'上流領域の転写調節領域を解析するため, S100A8の-1,500~+540の領域およびS100A9の-1,000~+430の領域を, ヒトDNAを鋳型とし *Sma* I および *Bgl* II サイトを付加したプライマー (表1) を用いて PCR により増幅し調製した。得られた PCR 産物をそれぞれ *Sma* I, *Bgl* II で消化した後, ホタルルシフェラーゼベクターである pGL3-basic Luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI, USA) の *Sma* I / *Bgl* II 部位に組み込んだ。挿入部位については DNA シークエンスにより確認した。

得られたそれぞれのプラスミドを *Nhe* I, *Kpn* I で切断し, Exonuclease III (宝酒造) および *S*1 nuclease (宝酒造) 処理を行い, 末端を Klenow fragment (宝酒造) で修復した後, ライゲーション (Ligation High, TOYOBO, 東京) を行った。得られた各欠失変異株については, DNA シークエンスを行うことにより欠失部位の確認を行った。

6. ルシフェラーゼアッセイ

各欠失変異株と内部指標としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む phRL-TK (Promega) とを30:1の比で混合し, 導入試薬として Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた重トランスフェクションを行った。ネガティブコントロールとして pGL3-basic luciferase vector を用いた。トランスフェクション24時間後1.2 mM CaCl₂ で分化を誘導し, さらに24時間後 Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) にてルシフェラーゼ活性を測定した。すなわち, 細胞を PBS(-) で洗浄後, 100 μ l PBS(-) を加え凍結融解させたのち, 細胞を回収して, 80 μ l Dual-Glo Luciferase Buffer を加え, ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。引き続き Stop & Glo Buffer を加え, ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性値は以下のとおり算出し, vector の発現量を1とした相対比で示した。

experimental sample ratio

$$= \frac{\text{ホタルルシフェラーゼ測定値}-\text{バックグラウンド}}{\text{ウミシイタケルシフェラーゼ測定値}-\text{バックグラウンド}}$$

7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

上皮細胞に10 ng/ml IL-1 α , 10 ng/ml TGF- β , 1.0 mM CaCl₂ を加え24時間培養し, NucBuster TM protein Extraction Kit (Novagen, Farmstadt, Germany) を用いて核蛋白を抽出した。すなわち, 上皮細胞を0.05% trypsin-EDTA で処理し, 遠心後, 細胞を PBS(-) で洗浄し, 細胞に extraction reagent I を加えて15秒間攪拌した後, 15分間氷冷した。次に, 16000 x g, 4°C で5分間遠心して得られた沈査を PBS(-) で洗浄し, 100 mM DTT と protease inhibitor を含む extraction reagent II で溶解させた。さら

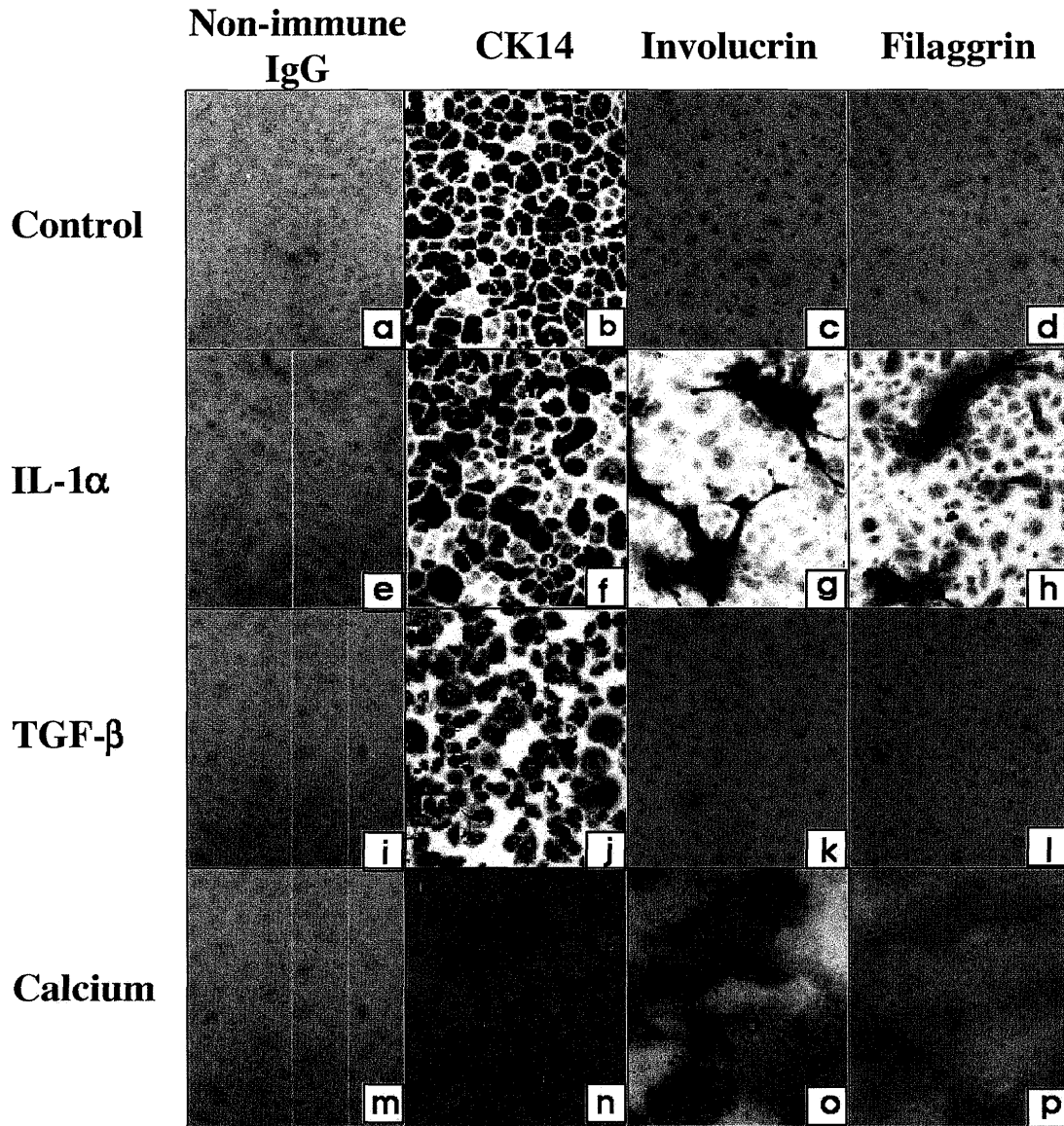


図1 培養歯肉上皮細胞における CK14, involucrin, filaggrin の免疫組織化学分析

歯肉上皮細胞を I 型コラーゲンコートスライドガラスに播種し、2 日間培養した後、各種因子を加えて 48 時間培養した。引き続き、抗 CK14, 抗 involucrin, 抗 filaggrin および正常マウス IgG 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(倍率 x 100)。

に、5 分間氷冷させ、16000 x g、4℃で 5 分間遠心して得られた上清を核蛋白抽出物とした。EMSA は、DIG Gel Shift Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いてプロトコールに従い行われた。すなわち、CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) 結合部位を含む二本鎖 oligo 5'-GGTTTGCTGCTTAAG ATGCCTG-3' をジゴキシゲニンで標識してプローブとし、6 μ g の核蛋白質を 1 pmol のプローブと室温で 30 分インキュベートさせた後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を 0.4 x Tris-borate-EDTA buffer 中で行った。引き続き、Immobilon (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写させ、アルカリフォスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体と反応させ Chemiluminescence substrate

(CSPD) にて発光させた。その後、RU-X フィルム (富士フィルム) に露光させ、バンドを検出した。

結 果

1. IL-1 α , TGF- β , カルシウムが上皮細胞の分化に及ぼす影響

IL-1 α , TGF- β , カルシウム存在下で歯肉上皮細胞を 48 時間培養し、基底細胞分化マーカーである CK14, および有棘・顆粒細胞分化マーカーである involucrin と filaggrin の発現を免疫染色で確認した (図 1)。結果には示していないが、コントロール (a, b, c, d) および TGF- β 添加群 (i, j, k, l) ではほとんどの細胞が単層で増殖したが、IL-1 α (10 ng/ml) 添加群 (e,

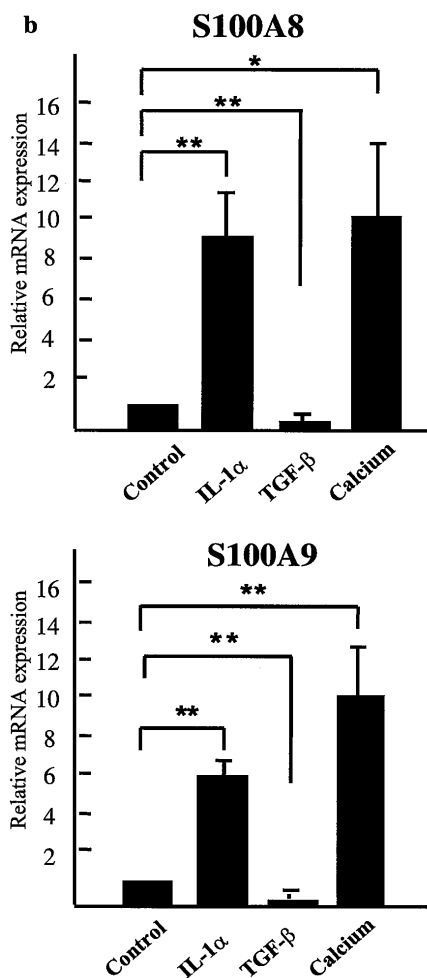
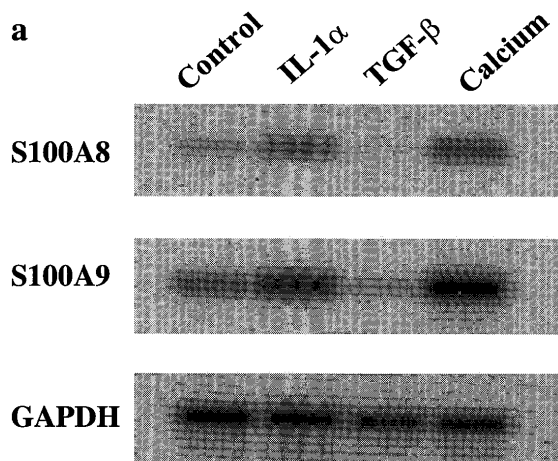


図2 培養歯肉上皮細胞のS100A8およびA9 mRNA発現に及ぼす各種因子の影響

(a) 歯肉上皮細胞を10 ng/ml IL-1α, 10 ng/ml TGF-β, 1 mM カルシウム存在下で36時間培養し, S100A8およびA9 mRNA発現をノーザンブロット分析により調べた。6回の実験を行った結果から代表的な1例を示す。(b) S100A8/A9 mRNA発現量をGAPDHのmRNA発現量で補正後, コントロールを1.00とした相対比で表示した。(n = 6, *p < 0.05, **p < 0.01)

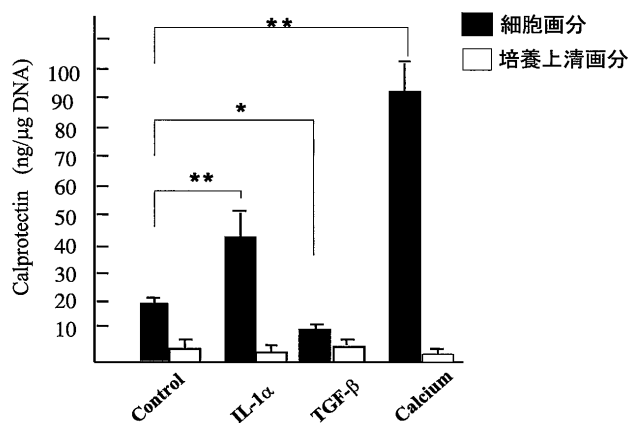


図3 培養歯肉上皮細胞のカルプロテクチン蛋白産生に及ぼす各種因子の影響

歯肉上皮細胞を10 ng/ml IL-1α, 10 ng/ml TGF-β, 1 mM カルシウム存在下で48時間培養し, 細胞画分(■)および培養上清画分(□)のカルプロテクチン量をELISA法にて測定した。データは蛋白量をDNA量で補正した平均値±標準誤差である。(n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01)

f, g, h)では部分的に細胞の重層化が認められ, カルシウム(1 mM)添加群(m, n, o, p)ではほとんどの細胞に重層化が認められた。また, コントロールではCK14を発現するが(b), involucrinやfilaggrinの発現は認められなかった(c, d)。IL-1α添加群ではCK14だけでなくinvolucrin, filaggrinが発現しており(g, h), カルシウム添加群でもCK14, involucrin, filaggrinの発現が認められた(n, o, p)。このようにIL-1αやカルシウムの添加による有棘・顆粒層の分化マーカーの発現が組織学的に確認された。一方, TGF-β(10 ng/ml)添加群ではCK14は発現していたが(j), involucrinやfilaggrinの発現は認められず(k, l), 分化の促進は観察されなかった。

2. IL-1α, TGF-β, カルシウムがS100A8およびA9のmRNA発現に及ぼす影響

IL-1α, TGF-β, カルシウム存在下で歯肉上皮細胞を36時間培養し, これらの因子がS100A8およびA9のmRNA発現に及ぼす影響を調べた(図2)。代表的なノーザンブロット像を図2aに, バンドの発現程度を定量化した値を図2bに示す。その結果, IL-1α添加群ではS100A8およびA9のmRNA発現はコントロールと比較して上昇し(図2a), S100A8は8.7倍, S100A9は5.8倍の上昇が認められた(図2b)。カルシウム添加群でもS100A8およびA9のmRNA発現が上昇しており(図2a), S100A8は9.9倍, S100A9は9.8倍の上昇を示していた(図2b)。一方, TGF-β添加群ではS100A8およびA9のmRNA発現が低下しており(図2a), S100A8はコントロールの0.3倍, S100A9は0.1倍しか発現していな

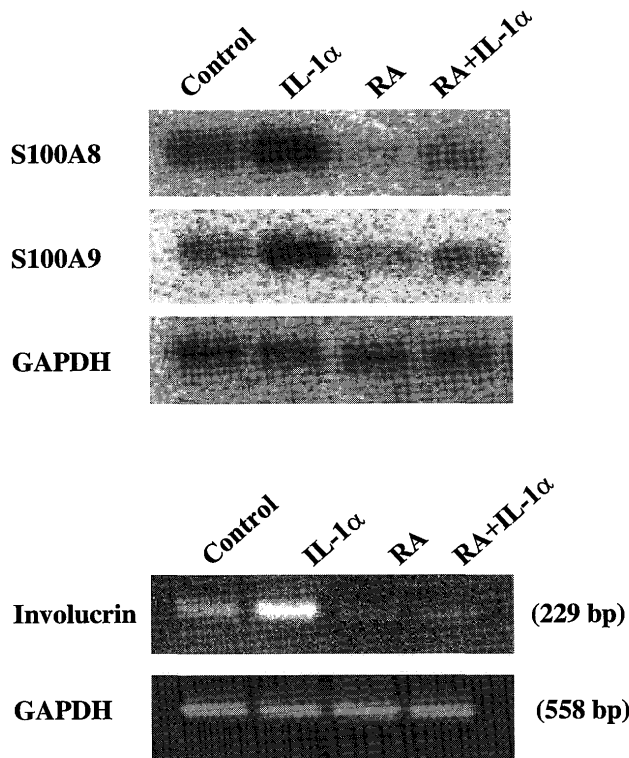


図4 IL-1 α によるカルプロテクチン発現上昇に及ぼすレチノイン酸の影響
 歯肉上皮細胞を10 ng/ml IL-1 α と300 μ g/ml レチノイン酸存在下で36時間培養し、S100A8/A9のmRNA発現量をノーザンブロット分析により解析した。involucrin mRNA発現はRT-PCR法で調べた。5回実験を行った結果から代表的な1例を示す。

かった(図2b)。このように、上皮細胞の分化を促進するIL-1 α とカルシウムはS100A8およびA9のmRNA発現を促進し、分化を抑制するTGF- β はS100A8およびA9のmRNA発現を抑制した。

3. IL-1 α , TGF- β , カルシウムがカルプロテクチン蛋白発現に及ぼす影響

IL-1 α , TGF- β , カルシウム存在下で歯肉上皮細胞を48時間培養後、細胞内および培養上清中のカルプロテクチン量を測定した(図3)。大部分のカルプロテクチンはどの群においても細胞画分に見出され、IL-1 α およびカルシウム添加群では、mRNA発現の結果(図2)と同様に細胞画分中カルプロテクチン産生が促進され、TGF- β 添加群では抑制されていた(図3)。一方、これらの因子は培養上清中のカルプロテクチン量に何ら影響を及ぼさなかった(図3)。結果には示していないが、0.5, 2, 4, 6, 12, 24, 72時間の培養でも各因子による作用は細胞内および培養上清中で同様の結果を示した。

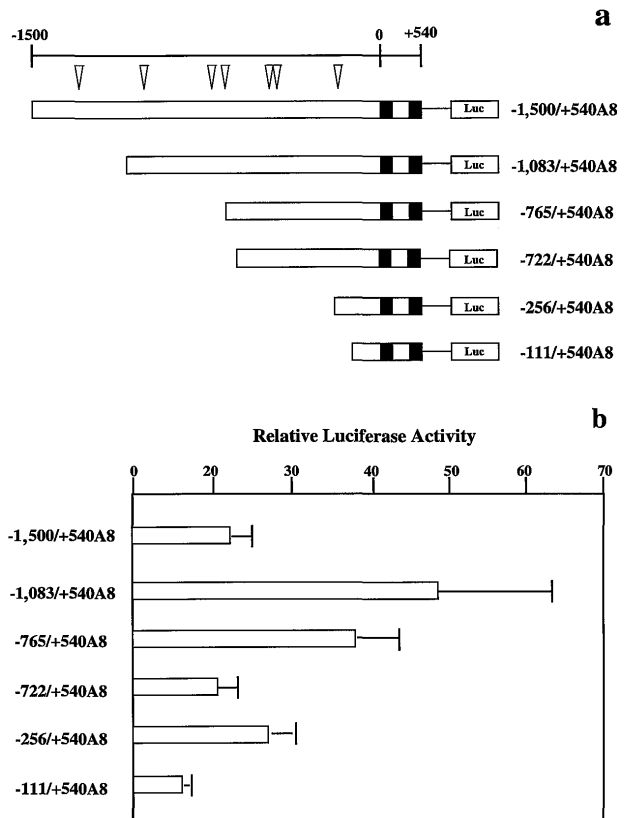


図5 S100A8 5' 上流領域の解析

(a) S100A8の-1,500~+540領域をpGL3-basicベクターに組み込み、得られたプラスミドであるpGL3-1,500/+540A8をもとに各欠損変異株を作製した。各欠損変異株のサイズとC/EBP結合部位の位置を示す(▽)。(b) 各欠損変異株のホタルルシフェラーゼ活性と内部指標のウミシイタケルシフェラーゼ活性の値から「材料と方法」で示すようにexperimental ratioを算出し、vectorの値を1.00とした相対比で示した。一回の実験につき、各欠損変異株6 wellずつ分析し、データは3回の実験から得られた平均値 \pm 標準誤差である。

4. IL-1 α によるカルプロテクチン発現上昇に及ぼすレチノイン酸の影響

IL-1 α が誘導するS100A8およびA9の発現上昇が分化促進に伴うものであるかどうかを調べるために、上皮細胞分化抑制因子であるレチノイン酸を添加して歯肉上皮細胞を36時間培養し、S100A8およびA9に加え、involucrinのmRNA発現を調べた。IL-1 α 単独添加では、コントロールと比較してS100A8およびA9のmRNA発現、involucrinのmRNA発現はともに上昇し、レチノイン酸単独添加では抑制が認められた(図4)。さらにレチノイン酸とIL-1 α の共存下では、IL-1 α によって上昇したS100A8およびA9のmRNA発現はレチノイン酸単独添加の場合と同様に抑制された(図4)。以上の結果から、IL-1 α によって誘導される上皮細胞の分化促進およ

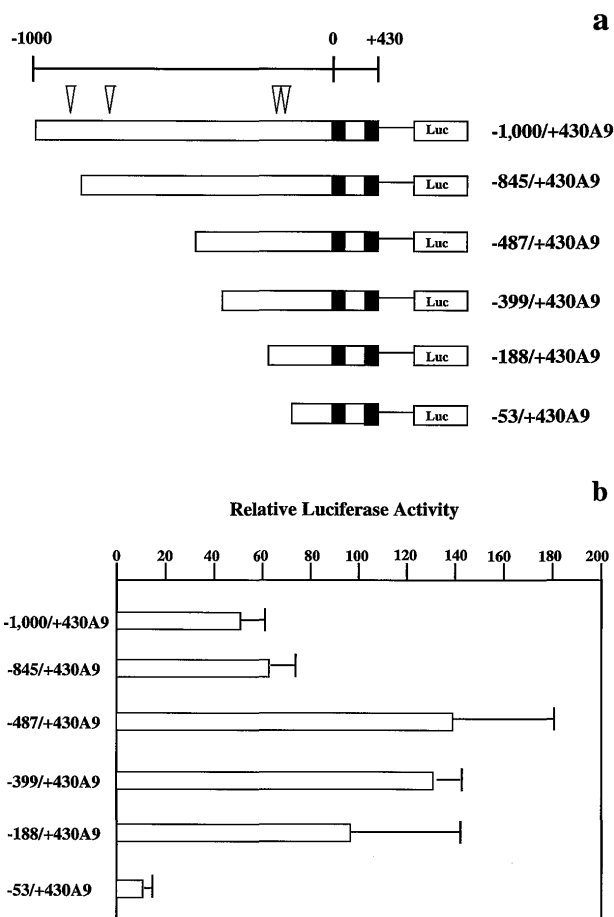


図6 S100A9 5' 上流領域の解析

(a) pGL3-1,000/+430A9 をもとに作製した各欠損変異株のサイズと C/EBP 結合部位の位置を示す(▽)。(b) 各欠損変異株のホタルルシフェラーゼ活性と内部指標のウミシイタケルシフェラーゼ活性の値から「材料と方法」で示すように experimental ratio を算出し、vector の値を1.00とした相対比で示した。一回の実験につき、各欠損変異株 6 well ずつ分析し、データは3回の実験から得られた平均値±標準誤差である。

びカルプロテクチンの発現促進は分化抑制因子であるレチノイン酸により抑制されることが明らかとなった。

5. S100A8 および A9 遺伝子の転写活性に及ぼすカルシウムの影響

図5aにS100A8欠損変異株のサイズを、図5bに各欠損変異株のルシフェラーゼ活性を示す。S100A8欠損変異株についてルシフェラーゼ活性を比較すると、-722/+540A8欠損変異株と-111/+540A8欠損変異株ではルシフェラーゼの活性が著しく減少していた。(図5b)。なお、S100A8の-765~-722、-256~-111領域にはそれぞれC/EBP結合部位が存在していた(図5a)。次に、図6aにS100A9欠損変異株のサイズ

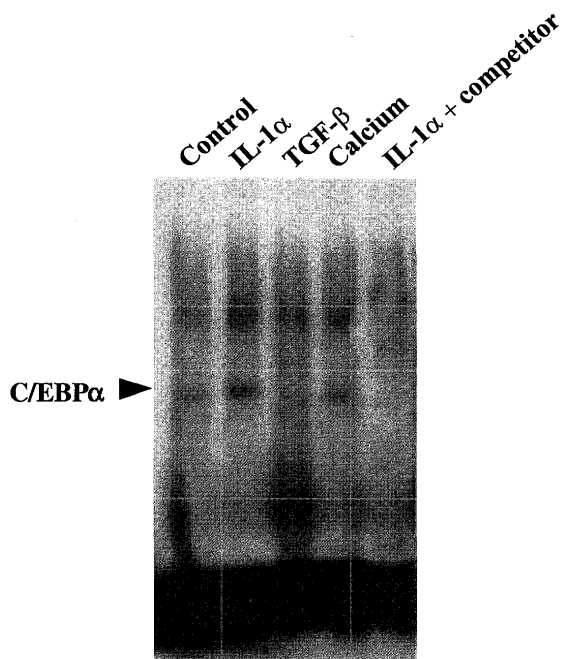


図7 EMSAによるC/EBPα DNA結合活性の分析

10 ng/ml IL-1α, 10 ng/ml TGF-β, 1 mM カルシウム存在下でHaCaT細胞を24時間培養後、核蛋白を抽出した。6 μgの核蛋白をジギキニン標識したオリゴヌクレオチドと反応させた後、EMSAを行い、C/EBPα DNA結合活性を分析した。バンドの特異性を検出するために100倍の非標識オリゴヌクレオチドを加え競合させた。

を、図6bに各欠損変異株のルシフェラーゼ活性を示す。その結果、-53/+430A9欠損変異株でルシフェラーゼ活性は最も減少していた(図6b)。また、2カ所のC/EBP結合部位が-188~-53領域に認められた(図6a)。

6. IL-1α, TGF-β, カルシウムがC/EBPαのDNA結合能に及ぼす影響

IL-1α, TGF-β, カルシウム存在下でHaCaT細胞を24時間培養後、EMSAにてC/EBPα DNA結合活性を調べた(図7)。その結果、コントロールにおいてもC/EBPα DNA結合活性が認められるが、IL-1αおよびカルシウム添加群では結合活性のさらなる上昇が認められた。一方、TGF-β添加群では、コントロールと比較して活性の低下が認められた。

考 察

カルプロテクチンは炎症組織で強い発現がみられ、単球系細胞ではLPSやいくつかの炎症性サイトカインによって発現が促進される¹²⁾。一方、カルプロテクチンは正常な口腔上皮組織の有棘層に局限して存在しており²³⁾、分化能を喪失した上皮細胞株ではカルプロテクチンの発現がみられないことが報告されている²⁴⁾。本研究

では歯肉上皮でのカルプロテクチン発現が分化と関連している可能性を考え、上皮細胞の分化を調節する因子を用いて検討を行った。その結果、カルプロテクチンの発現は上皮細胞の分化を促進する因子では上昇し、逆に分化を抑制する因子では低下した。

S100A8, A9を含むEFバンドを有するS100カルシウム結合性蛋白スーパーファミリー遺伝子群は1q21上にあるEpidermal Differentiation Complex (EDC) に存在している³³⁾。EDCはヒト上皮分化に関与する遺伝子群のクラスターであり、上皮細胞分化に関与するinvolucrinやloricrin, small proline-rich proteins (SPRRs) など上皮細胞骨格蛋白を含む遺伝子をコードしている³⁴⁾。以上の報告から、S100A8およびA9とEDCの遺伝子発現は相互に関連している可能性が高く、カルプロテクチンの発現に上記の因子が関わっていることも十分に考えられる。上皮細胞でのカルプロテクチンの発現については、炎症性サイトカインのTNF- α がS100A8およびA9の発現を上昇させることが報告されており²⁷⁾、また本研究の予備実験においてもIL-1 β やTNF- α がS100A8およびA9のmRNA発現を増加させることを見出している。一方、上皮細胞の分化を促進することが知られているIL-1 α は上皮細胞によって恒常的に産生され³⁵⁾、上皮細胞が産生するIL-1 α は他の組織と比較して100倍の濃度で存在しており³⁶⁾、オートクライン的に機能している³⁷⁾。本研究では、歯肉上皮細胞においてIL-1 α がカルプロテクチン発現を促進し、TGF- β がその発現を抑制することを初めて見出した。さらに、分化を抑制するレチノイン酸がIL-1 α 誘導性のカルプロテクチンとinvolucrinの発現を抑制することから、カルプロテクチン発現と上皮細胞分化が関連していることが裏付けられた。ところで、上皮細胞の分化を促進するIL-1 α やカルシウムはカルプロテクチンばかりでなく、上皮細胞により産生される抗菌ペプチドの β -ディフェンシンの発現も促進する^{38, 39)}。この結果は、カルプロテクチンや β -ディフェンシンなどの上皮由来の抗菌物質の発現が細胞の分化に依存している可能性を示唆しているものと考えられる。

β -ディフェンシンの発現は有棘細胞層で発現するが、IL-1 α による分化誘導とともに角化細胞層へと移動し、上皮表層で抗菌バリアーを形成することから、 β -ディフェンシンが分化と関連して発現するという生理的意義が示されている³⁸⁾。一方でカルプロテクチンは有棘細胞層に局限して発現し、角化細胞層での発現は認められない²³⁾。このことから、歯肉上皮におけるカルプロテクチンの発現は、より深層へと侵入した細菌に対するバリアーとして働く可能性が考えられる。歯周病原菌*P. gingivalis*や*Actinobacillus actinomycetemcomitans*は歯肉上皮細胞内に侵入することが知られているが^{40, 41)}、カルプロテクチンは上皮細胞層に侵入した歯周病原菌の深層への増殖を抑制することで感染の拡大を予防しているという見方ができる。さらに、カルプロテクチンはケモカ

インと同様に白血球遊走を促進させる^{14, 15)}のに加え、細菌侵入により破壊された上皮細胞からカルプロテクチンが細胞外へ遊離され、結果的に歯肉上皮組織においてケモカイン様機能が発揮される可能性もあり、歯肉上皮におけるカルプロテクチンが多彩な機能を有していることが推察される。

本実験では、カルプロテクチン発現が上皮細胞分化と関連して発現しているという観点から、カルシウムで分化が誘導されるHaCaT細胞株を用いてS100A8およびS100A9遺伝子の5'上流領域の解析を行ったが、Klemptらの結果²⁹⁾とは異なる結果が得られた。すなわち、Klemptらは上皮細胞株TR146においてビタミンD₃刺激によりS100A9が誘導される際のS100A9遺伝子転写調節ドメインについて検討し、S100A9の-462/-600ドメインにエンハンサーが存在すること²⁹⁾を見出したが、この領域にはC/EBPの結合部位は存在せず、C/EBPの関与についても触れられていない²⁹⁾。本実験では、カルシウムによって誘導されるカルプロテクチン発現においてS100A9については-188/-53ドメインにエンハンサーの存在が示唆され、この領域に共通してC/EBP結合部位が認められることから、C/EBPがS100A8/A9発現に関与する可能性が高いと考えられた。以上より、情報伝達経路が異なれば活性化される調節ドメインの部位が異なり、S100A8およびA9の転写・発現に関与する転写因子は複数存在することが考えられる。したがって、IL-1 α が誘導するカルプロテクチンの転写発現調節において活性化される調節ドメインについて今後さらに検討が必要であると思われる。

C/EBPsはロイシンジッパー型の転写因子であり、スーパーファミリーとしてC/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP γ , GADD153などが見出されている。C/EBPsは肝臓や脂肪細胞での発現が報告され、肝細胞、脂肪細胞の分化関連遺伝子の転写発現調節に関与していることが知られているが⁴³⁾、C/EBP α およびC/EBP β に関してはヒトおよびマウスの上皮細胞での発現も報告されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。マウスの皮膚上皮ではC/EBP α は基底層上部構造では著しく発現を認めるものの、基底細胞での発現は微弱であることが報告されている^{44, 45)}。C/EBP α は上皮細胞の分化促進に関与し⁴⁷⁾、上皮細胞分化マーカーであるinvolucrinの転写と発現⁴⁸⁾、K1, K10およびEDCに存在するfilaggrin, loricrinの発現にも関与する⁴⁷⁾ことから、C/EBP α が複数の上皮分化マーカーの遺伝子の発現を制御し、上皮細胞の分化調節に関与すると考えられている。また、C/EBP β は上皮細胞の初期の分化促進に関与し⁴⁶⁾、この2つの転写因子C/EBP α , C/EBP β は結合部位を共有する⁴⁹⁾ので、本実験においてもカルプロテクチンの発現にC/EBP α に加え、C/EBP β が関与する可能性が考えられる。単球細胞株HL-60ではS100A9発現にC/EBP α が関与するという報告²⁸⁾があるが、S100A8およびA9の発現におけるC/EBP α とC/EBP β の関与の度合いにつ

いては今後さらなる検討が必要である。一方、各上皮細胞分化調節因子と C/EBP α の関連については、カルシウムは Protein kinase C を活性化した後、MAP を介して C/EBP α を活性化させる経路が考えられ⁴⁸⁾、IL-1 α は NF- κ B および C/EBP α , C/EBP β を誘導すると言われて⁵¹⁾いる。また、上皮細胞分化抑制因子である TGF- β は、カルプロテクチン発現を抑制し、同時に C/EBP α DNA 結合活性を低下させたことから C/EBP α の関与が示唆された。このような結果からも、本実験において、カルプロテクチンの発現に C/EBP α が重要な転写因子として働いている可能性が強いと考えられる。

結 論

歯肉上皮細胞において、カルプロテクチンの発現は上皮の分化促進因子である IL-1 α およびカルシウムによって上昇し、分化抑制因子である TGF- β によって低下した。その動態は上皮細胞の分化指標 (CK14, involucrin, filaggrin) の発現とも一致していたことから、歯肉上皮におけるカルプロテクチンの発現は上皮細胞の分化と関連することが示された。また、その発現調節に転写因子 C/EBP α が関与することが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野 (旧歯科保存学第二講座) 永田俊彦教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲御助言を戴きました口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授、歯科保存学分野 松尾敬志教授に深謝致します。また直接御指導と御助言を戴いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野 木戸淳一助教授、徳島大学ゲノムセンター遺伝子発現分野 片岡正俊助教授、ガジヤマダ大学歯学部歯周病講座 Suryono 講師および徳島大学ゲノムセンター遺伝子発現分野 篠原康男教授および同センター分子機能解析分野 塩見美喜子助教授に厚く御礼申し上げます。最後に数々の御教示と御援助を戴いたヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- Williams RC: Periodontal disease. N Engl J Med 322, 373-382 (1990)
- Fuchs E: Epidermal differentiation: The bare essentials. J Cell Biol 111, 2807-2814 (1990)
- Huang GT, Haake SK and Park NH: Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. J Periodontol 69, 1105-1110 (1998)
- Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN and Dale BA: Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. Infect Immun 66, 4222-4228 (1998)
- Ross KF and Herzberg MC: Calprotectin expression by gingival epithelial cells. Infect Immun 69, 3248-3254 (2001)
- Putsep K, Carlsson G, Boman HG and Andersson M: Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus kostmann: and observation study. Lancet 360, 1144-1149 (2002)
- Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P and Dale I: Calprotectin (The L1 leukocyte protein). Stimulus response coupling: The role of intercellular calcium-binding proteins. Scand J Haematol 187-210, (1990)
- Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy AR and Lehrer RI: In vitro antimicrobial activity of human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. J Dent Res 72, 517-523 (1993)
- Sander J, Fagerhol MK and Bakken JS and Dale I: Plasma levels of leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. Scand J Clin Lab Invest 44, 357-362 (1984)
- Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M and Nagata T: Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. J Clin Periodontol 26, 653-657 (1999)
- Nakamura T, Kido J, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M and Nagata T: The association of calprotectin level in gingival crevicular fluid with gingival index and the activities of collagenase and aspartate aminotransferase in adult periodontitis patients. J Periodontol 71, 361-367 (2000)
- Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M and Nagata T: Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β on calprotectin release in human monocytes. J Periodontol 74, 1719-1724 (2003)
- Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK and Nagata T: Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14-Toll-like receptor-nuclear factor κ B pathway. J Periodontol Res 38, 557-563 (2003)
- Steinbakk M, Naess-Andresen CF and Lingaas E, Dale I Brandtzaeg P and Fagerhol MK: Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 336, 763-765 (1990)
- Srikrishna G, Panneerselvam K, Westphal V, Abraham

- V, Varki A and Freeze HH: Two proteins modulation transendothelial migration of leukocyte recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J Immunol* 166, 4678-4688 (2001)
- 16) Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M and Tessier PA: Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170, 3233-3242 (2003)
- 17) Nacken W, Roth J, Sorg C and Kerkhoff C: S100A9/A8: Myeloid representative of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech* 60, 569-580 (2003)
- 18) Thorey IS, Roth J, Regenbogen J, Halle JP, Bittner M, Vogl T, Kaesler S, Bugnon P, Reitmaier B, Durka S, Graf A, Wockner M, Rieger N, Konstantinow A, Wolf E, Goppelt A and Werner S: The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 276, 35818-35825 (2001)
- 19) Nisapakultorn K, Ross KF and Herzberg MC: Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 69, 4242-4247 (2001)
- 20) Nisapakultorn K, Ross KF and Herzberg MC: Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 69, 3692-3696 (2001)
- 21) Goebeler M, Roth J, Bos C, Ader G and Sorg C: Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem J* 309, 419-424 (1995)
- 22) Warner-Bartnicki AL, Murao S, Collart FR and Huberman E: Regulated expression of MRP8 and MRP14 genes in human promyelocytic leukemia HK-60 cells treated with the differentiation-inducing agents mycophenolic acid and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Exp Cell Res* 204, 241-246 (1993)
- 23) Saintigny G, Schmidt R, Shroot B, Juhlin L, Reichert U and Michel S: Differential expression of calgranulin A and B in various epithelial cell lines and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 99, 638-644 (1992)
- 24) Eversole LR, Miyasaki KT and Christensen RE: The distribution of the antimicrobial protein, calprotectin, in normal oral keratinocytes. *Arch Oral Biol* 37, 963-968 (1992)
- 25) Eller MS, Yaar M, Ostrom K, Harkness DD and Gilchrist BA: A role for interleukin-1 in epidermal differentiation: regulation by expression of functional versus decoy receptors. *J Cell Science* 108, 2741-2746 (1995)
- 26) Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M and Toyoshima K: Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 886-890 (1997)
- 27) Jansen BJ, Ruissen F, Jongh G, Zeeuwen PL and Schalwijk J: Serial analysis of gene expression in differentiated cultures of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 116, 12-22 (2001)
- 28) Kerhoff C, Hofmann HA, Vormoor J, Melkonyan H, Roth J, Sorg C and Klempt M: Binding of two nuclear complexes to a novel regulatory element within the human S100A9 promoter drives the S100A9 gene expression. *J Biol Chem* 277, 41879-41887 (2002)
- 29) Klempt M, Melkonyan H, Hofmann HA and Sorg C: Identification of epithelial and myeloid-specific DNA elements regulating MRP14 gene transcription. *J Cell Biochem* 73, 49-55 (1999)
- 30) Matsuyama T, Izumi Y and Sueda T: Culture and characterization of human junctional epithelial cells. *J Periodontol* 68, 229-239 (1997)
- 31) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuts D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771 (1988)
- 32) Labarca C and Paigen K: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102, 344-352 (1979)
- 33) Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A and Ziegler A: Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S-100 calcium-binding complex ("Epidermal Differentiation Complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106, 989-992 (1996)
- 34) Marenholz I, Volz A, Ziegler A, Davies A, Ragoussis I, Korge BP and Mischke D: Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig. *Genomics* 37, 295-302 (1996)
- 35) Kupper TS, Ballard DW, Chua AO, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC, Langdon RL, Lightfoot L and Gubler U: Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin-1 α and β mRNA. *J Exp Med* 164, 2095-2100 (1986)
- 36) Kupper TS and Groves RW: The interleukin-1 axis in cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 105, 62S-66S (1995)
- 37) Schroder JM: Cytokine networks in the skin. *J Invest*

- Dermatol 105, 20S-24S (1995)
- 38) Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L and Ganz T: Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 118, 275-281 (2002)
 - 39) Krisanaprakornkit S, Jokitasthira D and Dale BA: Intracellular calcium in signaling human beta-defensin-2 expression in oral epithelial cells. *J Dent Res* 82, 877-882 (2003)
 - 40) Lamont R, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D and Weinberg A: *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 63, 3878-3885 (1995)
 - 41) Sreenivasin PK, Meyer DH and Fives-Taylor PM: Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitance*. *Infect Immun* 61, 1239-1245 (1993)
 - 42) Bikle DD: Vitamin D and skin cancer. *J Nutr* 134, 3472S-3478S (2004)
 - 43) Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon JJ, Landschulz WH and McKnight SL: Tissue-specific expression, development regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer-binding protein. *Genes Dev* 3, 1146-1156 (1989)
 - 44) Oh HS and Smart RC: Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J Invest Dermatol* 110, 939-945 (1998)
 - 45) Maytin EV and Habener JF: Transcription factors, C/EBP α , C/EBP β and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation programs of keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Invest Dermatol* 110, 238-246 (1998)
 - 46) Zhu S, Oh HS, Shim M, Sterneck E, Johnson P and Smart RC: C/EBP β modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19, 7181-7190 (1999)
 - 47) Yuspa SH, Kilkenny A, Cheng C, Roop D, Hennings H, Kruszewski F, Lee E, Strickland J and Greenhalgh DA: Alterations in epidermal biochemistry as a consequence of stage-specific genetic changes in skin carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 93, 3-10 (1991)
 - 48) Efimova T, Deucher A, Kuroki T, Ohba M and Eckert RL: Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activation a p38 δ mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein α . *J Biol Chem* 277, 31753-31769 (2002)
 - 49) Osada S, Yamamoto H, Nishihara T and Imagawa M: DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271, 3891-3896 (1996)
 - 50) Klempt M, Melkonyan H, Hofmann HA, Eue I and Sorg C: The transcription factors c-myb and C/EBP α regulate the monocytic/myeloid gene MRP14. *Immunobiology* 199, 148-151 (1998)
 - 51) La E and Fischer SM: Transcriptional regulation of intracellular IL-1 receptor antagonist gene by IL-1 α in primary mouse keratinocytes. *J Immunol* 166, 6149-6155 (2001)